



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

Desorden Conformacional de la Triosafosfato Isomerasa de Humano por la Mutación Glu 104 Asp

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciado en Nutrición

P R E S E N T A

Iván Francisco Celaya Correa

Bajo la Dirección de:
Dr. Hugo Nájera Peña.

Pachuca, Hgo., Enero 2009.



ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 1 |
| Resumen | 2 |
| Abstract..... | 3 |
| 1.- Introducción..... | 4 |
| 1.1 Proteínas | 4 |
| 1.1.1 Concepto | 4 |
| 1.1.2 Clasificación de las proteínas | 4 |
| 1.1.3 Estructura de las proteínas | 5 |
| 1.2 Purificación de las proteínas | 7 |
| 1.2.1 Precipitación de la proteína..... | 7 |
| 1.2.2 Cromatografía | 8 |
| 1.2.2.1 Cromatografía de exclusión molecular | 9 |
| 1.2.2.2 Cromatografía de intercambio iónico | 9 |
| 1.2.2.3 Electroforesis..... | 11 |
| 1.3 Plegamiento de las proteínas | 12 |
| 1.3.1 Termodinámica del plegamiento de proteínas..... | 12 |
| 1.4. Plegamiento anómalo de las proteínas | 14 |
| 1.4.1 Enfermedades del plegamiento anómalo de las proteínas..... | 15 |
| 1.5 Triosafosfato isomerasa | 15 |
| 1.5.1 Deficiencia de la triosafosfato isomerasa | 17 |
| 1.6 Desnaturalización y renaturalización | 18 |
| 1.7 Cinética enzimática (K_m y V_{max})..... | 19 |
| 2.- Planteamiento del problema..... | 21 |
| 3.- Justificación..... | 22 |
| 4.- Objetivos | 23 |
| 4.1 Objetivo general | 23 |
| 4.2 Objetivos específicos | 23 |
| 5.- Metodología | 24 |

| | |
|--|----|
| 5.1 Equipos y técnicas | 24 |
| 5.2 Construcción de la mutante Glu 104 Asp | 25 |
| 5.3 Expresión y purificación de la mutante Glu 104 Asp | 26 |
| 5.3.1 Expresión | 26 |
| 5.3.2 Rompimiento | 26 |
| 5.3.3 Purificación | 27 |
| 5.4 Actividad catalítica de la mutante Glu 104 Asp | 29 |
| 5.5 Mediciones espectroscópicas de la mutante Glu 104 Asp | 30 |
| 5.6 Reversibilidad | 30 |
| 6.-Resultados y Discusión | 31 |
| 6.1 Purificación de la mutante Glu 104 Asp | 31 |
| 6.2 Reversibilidad | 34 |
| 6.2.1 Espectros de fluorescencia intrínseca | 34 |
| 6.2.2 Actividad catalítica de la HTPI _{E104D} | 43 |
| 6.3 Determinación de K_m y V_{max} de la HTPI _{E104D} | 45 |
| 7.- Conclusiones..... | 48 |
| 8.- Perspectivas..... | 49 |
| 9.- Bibliografía | 50 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| DHAP | Dihidroxiacetona fosfato |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FPLC | Cromatografía líquida rápida de proteínas, del inglés “Fast Protein Liquid Chromatography” |
| G3P | D-gliceraldehído-3-fosfato |
| GuHCl | Cloruro de guanidina |
| αGDH | α -glicerolfosfato deshidrogenasa |
| hTPI | Triosafofosfato isomerasa de humano |
| HTPI_{E104D} | Triosafofosfato isomerasa de humano con la mutación Glu 104 Asp |
| IPTG | β -D-1-tiogalactopiranosido |
| K_m | Constante de Michaelis-Menten |
| M | Concentración molar |
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida) |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “Polymerase Chain Reaction” |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetanosulfonato |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| TEA | Trietanolamina |
| TED | Amortiguador trietanolamina, ácido etilendiaminotetraacético, ditiotreitol |
| TPI | Triosafofosfato isomerasa |
| V_{max} | Velocidad máxima |

RESUMEN

Las proteínas son polímeros de aminoácidos que ejecutan la mayor parte de las funciones vitales. Existen procedimientos por medio de los cuales se puede obtener la purificación de las proteínas, tales como la cromatografía que es el proceso por medio del cual se separan las proteínas de acuerdo con las propiedades moleculares como el tamaño, la forma y el peso. En el proceso de electroforesis las moléculas son separadas unas de otras, debido a su carga y peso molecular. El plegamiento de las proteínas se lleva a cabo cuando la secuencia de aminoácidos de una proteína adopta la estructura tridimensional que deriva en su forma nativa; el plegamiento anómalo de las proteínas conlleva a que se presenten anomalías que combinado con la disfunción celular pueden ser causantes de diversas enfermedades, como en el caso de la triosafosfato isomerasa (TPI) que es una proteína homodimérica, de cadenas de 27 kDa, citoplásmica, que actúa como catalizador en la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el D-gliceraldehído 3-fosfato (G3P), en la reacción 5 de la glucólisis. En el presente trabajo, se llevo a cabo el proceso de sobreexpresión y purificación de la TPI de humano con la mutación E104D (HTPI_{E104D}) logrando un elevado grado de pureza. La enzima mutante se desnaturalizó usando al cloruro de guanidina, presentó un mejor porcentaje de renaturalización a las 24 h, utilizando una concentración de 5 µg/mL de enzima. También se obtuvieron algunos parámetros cinéticos, dando como resultado para la mutante nativa 60.38 ± 2.12 µmol/ min·mg y de 0.76 ± 0.07 mM para V_{max} y K_m respectivamente. Mientras para la mutante renaturalizada los valores obtenidos fueron para V_{max} y K_m de 76.14 ± 2.48 µmol/ min·mg y de 0.95 ± 0.08 mM respectivamente. La K_m obtenida para la mutante HTPI_{E104D}, no presentó cambios significativos con respecto a la silvestre ni con otras especies. Sin embargo, existe una disminución considerable en el parámetro de V_{max} .

PALABRAS CLAVE: Proteínas, Plegamiento de proteínas, Enfermedades del plegamiento anómalo, triosafosfato isomerasa, Purificación de las proteínas.

ABSTRACT.

Proteins are polymers of amino acids that carry out most of the vital functions. There are procedures through which one can obtain the purification of proteins, such as chromatography which is the process by which proteins are separated according to molecular properties such as size, shape and weight. In the electrophoresis process molecules are separated due to charge and molecular weight. Protein folding is carried out when the amino acid sequence of a protein acquire the three-dimensional structure that results in the native state, protein misfolding leads to anomalies that occur combined with the cellular dysfunction causing different diseases, such as the triosephosphate isomerase (TPI) which is a homodimeric protein, from 27 kDa chains, cytoplasmic, catalyses the interconversion between dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and D-glyceraldehyde-3-phosphate, in reaction 5 of glycolysis. In this work, was carried out the overexpression and purification of Human TPI with E104D mutation, achieving a high purity degree. Mutant enzyme was denatured in the presence of guanidine chloride, showed a better renaturation percentage at 24 h, using [5µg/mL] of enzyme. It also obtained catalytic parameters, resulting in the native mutant to $60.38 \pm 2.12 \mu\text{mol/ min}\cdot\text{mg}$ and $0.76 \pm 0.07 \text{ mM}$ for V_{max} and K_{m} respectively. As for the mutant renaturalized values were obtained for V_{max} and K_{m} $76.14 \pm 2.48 \mu\text{mol/ min}\cdot\text{mg}$ and $0.95 \pm 0.08 \text{ mM}$ respectively. The K_{m} obtained for the mutant HTPI_{E104D}, did not present significant changes with regard to other species, in particular with those of the wild-tipe HTPI. However, there is a considerable decrease in the parameter of V_{max} .

KEYWORD: Protein, protein folding, protein misfolding, triosephosphate isomerase, purification of proteins

1.-INTRODUCCIÓN.

1.1 PROTEÍNAS.

1.1.1 CONCEPTO.

Las proteínas son cadenas polipeptídicas que se diferencian de los oligopéptidos en el número de aminoácidos que contienen, en su carácter funcional y sobre todo en que son el resultado del proceso de traducción genética. La conformación de una proteína hace referencia a su disposición espacial, aspecto de vital importancia, pues va a estar directamente relacionado con la función que desempeñan (Nelson y Cox, 2005).

Entre las funciones mas importantes están: reconocimiento molecular, transporte de moléculas, la función estructural, la catálisis de reacciones bioquímicas entre otras (González-Andrade y col., 2005).

1.1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

Las proteínas se dividen en dos grupos: fibrosas y globulares. Las proteínas fibrosas muestran en su estructura la repetición de elementos de estructura secundaria, como hélices α o hebras β , para formar fibras cilíndricas alargadas que son utilizadas como sostén estructural de células y tejidos.

Por otra parte, las proteínas globulares contienen, además de las hélices α y hebras β , estructuras no repetitivas como asas y giros, gracias a las cuales adoptan estructuras compactas y globulares con una función particular. Las proteínas globulares tienen la capacidad de reconocer a otras moléculas, tan pequeñas como el O_2 o tan grandes como ellas mismas (Chávez-Cárdenas y col., 2002).

1.1.3 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS.

ESTRUCTURA PRIMARIA.

La estructura primaria es la posición que ocupa cada aminoácido en la cadena polipeptídica, es decir la secuencia de la proteína. La importancia de este nivel radica en que la posición que ocupa cada aminoácido dentro de la cadena va a condicionar enormemente el resto de los niveles estructurales, además de la función que desempeña la proteína (Nelson y Cox, 2005).

El esqueleto polipeptídico consiste en enlaces covalentes, llamados peptídicos, enlazados mediante el C' (carbono del carboxilo) de los aminoácidos originales y el grupo amino del otro aminoácido (Jaenicke, 1987).

ESTRUCTURA SECUNDARIA.

La estructura secundaria es el resultado de los enlaces de hidrógeno locales que se crean a lo largo de la cadena polipeptídica. Estos enlaces dan solidez y flexibilidad a la proteína. Hace referencia a la ordenación regular y periódica de la cadena polipeptídica en una dirección determinada. Básicamente, podemos encontrar dos tipos de estructura secundaria, la hélice- α y la conformación- β (Nelson y Cox, 2005)

En la hélice α , la cadena polipeptídica adopta una conformación helicoidal. Las Estructuras helicoidales se caracterizan por el número de aminoácidos por vuelta y por su distancia entre vueltas. Esta conformación se estabiliza por puentes de hidrógeno. Además, los grupos -R de los aminoácidos se disponen hacia fuera de la hélice evitando las interacciones estéricas y estabilizando la conformación.

En las hebras- β , la cadena adopta una ordenación lineal en la que los grupos -R, de los aminoácidos, se van alternando por encima y por debajo del plano del enlace peptídico. Esta conformación se estabiliza con puentes de hidrógeno entre varias cadenas de proteínas con conformación- β . El resultado de estas

interacciones es la hoja plegada β , que puede presentar un plegamiento paralelo, (en el que las cadenas vecinas se desarrollan en la misma dirección), o bien un plegamiento antiparalelo con cadenas vecinas en direcciones opuestas (Nelson y Cox, 2005).

ESTRUCTURA TERCIARIA.

La estructura terciaria de una proteína se determina de acuerdo al arreglo de los diferentes elementos de estructura secundaria en el espacio. Las proteínas globulares se pliegan en dominios compactos que contienen entre 40 y 300 aminoácidos. La cadena atraviesa el glóbulo en sus dos formas principales: hélice- α o β . La conformación espacial de las proteínas depende lógicamente de su estructura primaria, así las cadenas laterales de los aminoácidos en las proteínas globulares se hallan distribuidas espacialmente de acuerdo con sus polaridades (Fernández-Velasco, 2002).

Los restos no polares aparecen, casi siempre, en el interior de la proteína, para no entrar en contacto con el disolvente acuoso que la envuelve, creando un ambiente hidrofóbico. Los residuos polares con carga se hallan situados, normalmente en la zona externa, interaccionando con el medio acuoso. A veces, se requiere de estos centros en la parte interna de la proteína y en estos casos también ocurre que están directamente implicados en alguna funcionalidad de la proteína, bien a nivel estructural o bien a nivel catalítico (Nelson y Cox, 2005).

ESTRUCTURA CUATERNARIA.

Un gran número de proteínas, conocidas como oligómeros, están formadas por la asociación no covalentes de dos o más moléculas. La estructura cuaternaria, esta determinada por el número y orientación de las subunidades, existen dímeros formados por subunidades idénticas llamados homodímeros, o por subunidades diferentes llamados heterodímeros. Las interacciones que existen entre el contacto

de las subunidades son muy similares a las que se presentan en los monómeros. Entre las cuales predominan las interacciones entre grupos no polares, puentes de hidrogeno, interacciones entre grupos cargados y puentes de disulfuro (Fernández-Velasco, 2002).

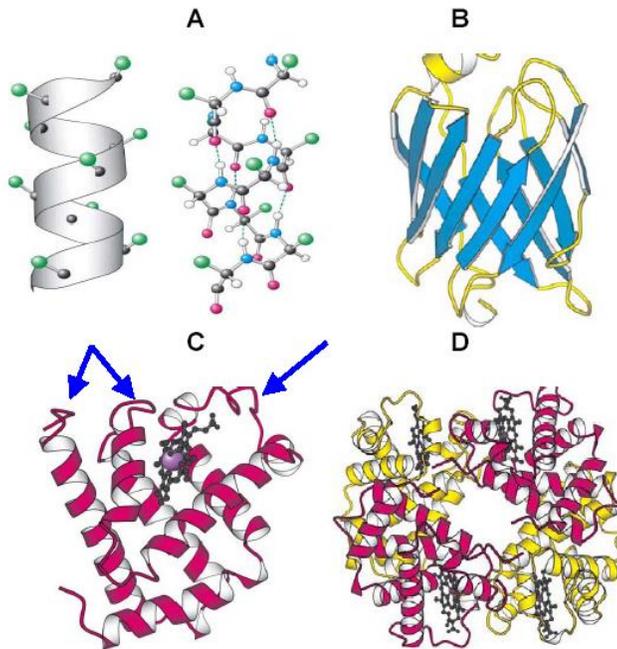


Figura 1. Representación de los diferentes niveles estructurales de las proteínas.

A: hélice- α . B: lamina- β . C: estructura terciaria D: estructura cuaternaria.

Fuente: González-Andrade y colaboradores, 2005.

1.2.-PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

1.2.1 PRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA.

La solubilidad de las proteínas depende de la concentración de sales, del pH, temperatura y polaridad del solvente. A concentraciones bajas de sal, se condiciona a que la solubilidad de las proteínas aumente, en contraste, cuando se aumenta la concentración de sal, se genera la precipitación de las proteínas (Fernández- Velasco, 2002).

El proceso inicial para la purificación de proteínas es el método de *salting out*; en donde el principio de la técnica es el agregar concentraciones elevadas de sales, para precipitar a las proteínas. La sal usada normalmente es el sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, debido a que cada proteína tiene un punto de “salting out”, esta técnica ayuda a eliminar muchas impurezas (Mckee y Mckee, 2003).

La precipitación se produce ya que se forman partículas por agregación; cuando se añade la sal, se aumenta la solubilidad de las proteínas, debido a que los coeficientes de actividad de los grupos ionizantes disminuyen, derivando en una competencia por las moléculas de disolvente entre la sal y la proteína; las moléculas de agua no solvatan la proteína, por lo tanto esta se agrega y precipita (Willard, 1998).

1.2.2 CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía es el proceso por medio del cual una solución, es percolada a través de una matriz porosa o resina, que retrasa el progreso de los componentes de la proteína, de acuerdo a las características particulares de cada soluto (Fernández-Velasco, 2002).

Existen varias técnicas de cromatografía que pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas de acuerdo con las propiedades moleculares, tales como el tamaño, la forma y el peso, o determinadas afinidades de unión. En los diferentes métodos cromatográficos, la mezcla proteica se disuelve en un líquido, a esto se le llama fase móvil. Al pasar las proteínas a través de la fase estacionaria (alguna matriz sólida), se separan unas de otras, debido a la diferenciación entre cada fase (Mckee y Mckee, 2003).

1.2.2.1 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

La separación en cromatografía de partición y en cromatografía de intercambio iónico se logra de diferentes interacciones de solutos. En contraste, la separación en cromatografía de exclusión por tamaño se lleva a cabo por diferencias en tamaño molecular y la habilidad de diferentes moléculas para penetrar los poros de la fase estacionaria a diferentes tamaños o magnitudes.

La cromatografía de exclusión por tamaño se usa extensivamente para las separaciones preparativas de macromoléculas de origen biológico, así como para la purificación de polímeros sintéticos (HAPB, 2002).

Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados, agarosa y poliacrilamida. Todos estos geles se hallan constituidos por partículas de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado (Oh-Ishi y Maeda, 2002). Esta cromatografía, es también una herramienta analítica utilizada para determinar el peso molecular de las proteínas. A partir de proteínas con peso molecular conocido, se elabora una curva estándar, con la que se puede determinar el peso molecular de otras proteínas (Fernández-Velasco, 2002).

1.2.2.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

La cromatografía de intercambio iónico separa las proteínas de acuerdo con su carga (Mckee y Mckee, 2003). La separación se produce por absorción reversible de las moléculas cargadas por los grupos inorgánicos, de carga opuesta inmovilizados dentro de la fase estacionaria (Gómez-Moreno y Sancho, 2004).

Un intercambiador iónico consiste de una matriz sólida insoluble a la cual se unen de forma covalente grupos cargados. La matriz puede tener carga positiva o

negativa y los contraiones también. Los intercambiadores cargados positivamente tienen contraiones cargados negativamente (aniones) por lo que son llamados intercambiadores aniónicos. Intercambiadores cargados negativamente tienen contraiones cargados positivamente (cationes) y se les conoce como intercambiadores catiónicos. Los intercambiadores iónicos fuertes están completamente ionizados en un amplio rango de pH mientras que con los intercambiadores iónicos débiles, el grado de disociación y la capacidad de intercambio varían más marcadamente con el pH (Willard, 1998).

La cromatografía de intercambio iónico se presenta en 4 etapas (Oh-Ishi y Maeda, 2002).

1.- Equilibrado de la fase estacionaria.- en donde se deben favorecer las condiciones de pH y fuerza iónica que permitan la unión de las proteínas deseadas.

2.- Aplicación y muestra del lavado.- las muestras se deben encontrar en la misma concentración de amortiguador, que se utiliza para el equilibrado de la fase estacionaria, con esto permitirá que las proteínas con la carga adecuada desplacen a los contraiones y se adsorban reversiblemente a la matriz.

3.-Elución de las proteínas.- en este paso, se intercambia el pH, o más frecuentemente, se incrementa la fuerza iónica del amortiguador. Las proteínas eluyen en orden inverso a su fuerza de unión, que es determinado por el número de grupos cargados en la superficie.

4.- Regeneración.- en este ultimo proceso, se asegura que las proteínas que no han eluido bajo las condiciones aplicadas en principio, sean eluidas, con el propósito de asegurar la capacidad total del intercambiador para una nueva proteína.

1.2.2.3 ELECTROFORESIS.

La electroforesis se realiza utilizando geles de poliacrilamida o de agarosa. El gel, separa a las proteínas de acuerdo a su peso molecular y a su forma. Por esto, la electroforesis en gel resulta eficaz para la separación de mezclas complejas de proteínas u otras moléculas.

Se usa persulfato de amonio, que forma radicales libres que atacan a la poliacrilamida, haciendo que ésta polimerice. Se forma así una red en 3D; en función del tamaño del poro pasarán mejor unas proteínas concretas con respecto a otras. A mayor porcentaje de acrilamida, menor tamaño tendrá el poro (Willard, 1998).

Algunas características destacables de la electroforesis en geles de poliacrilamida son:

- Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato de amonio.
- Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas del gel.
- La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).
- El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se

separan bien en el rango 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño (HAPB, 2002).

1.3 PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS.

El plegamiento de las proteínas es el proceso por medio del cual la secuencia de aminoácidos de una proteína adopta la estructura tridimensional que conlleva a su forma nativa (Chitti y col., 1999). El proceso o reacción de conversión del estado desnaturalizado (D) al estado Nativo (N) se denomina plegamiento, y el proceso contrario desnaturalización (o desplegado). En este caso el plegamiento puede considerarse como la transición reversible de dos estados: el nativo (N) y el desnaturalizado (D) (Mateu y Neira, 2004).

Se considera que existe un gran número de factores que regulan el plegamiento *in vivo*, pero la transición entre la forma nativa y la desnaturalizada es un proceso que puede llevarse a cabo *in vitro* (Fernández-Velasco, 1995).

1.3.1 TERMODINÁMICA DEL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS.

El plegamiento de una proteína debe conducir al mínimo de energía libre, y la conducción de energía que se genera en el proceso debe estar determinada por el balance de dos términos: el entálpico (que se refiere a que en el plegamiento se debe optimizar al máximo la energía del sistema) y el entrópico (que se da cuando se aumenta el desorden en el universo).

Debido a que tanto el estado nativo como el desnaturalizado de la proteína deben mantenerse en equilibrio, el proceso de plegamiento será cuantificado en términos de termodinámica. El equilibrio entre el estado nativo(N) y el desnaturalizado (D) esta definido por la constante de equilibrio (K), como:

$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (1)$$

La diferencia de la energía libre entre el estado desnaturalizado y el nativo es determinado por medio de la siguiente formula:

$$\Delta G^\circ = -R T \ln K \quad (2)$$

En donde R es la constante universal de los gases, y T se refiere a la temperatura absoluta determinada en grados Kelvin. Se puede notar que la constante de equilibrio determinada en la formula 1 pertenece al proceso de desnaturalización, en tanto que un valor positivo en ΔG° indica que el estado nativo de la proteína es mas estable que el estado desnaturalizado

La energía libre también se ve determinada por cambios en la entalpía y entropía del proceso de desplegamiento:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (3)$$

En donde ΔH° son los cambios en la entalpía y ΔS° son los cambios en la entropía, dentro del proceso de desplegamiento (Murphy, 2001).

La teoría más moderna para explicar el plegamiento lo simula como un “embudo” o “cono” entrópico (entropy funnel). De acuerdo a esta teoría la proteína cuando se pliega se mueve como en un embudo, donde el diámetro del embudo da idea de la entropía de la cadena y la profundidad determina la energética del sistema. Así la proteína desplegada se asume que está en el borde superior del cono, con energía (interna) poco óptima pero mucha entropía (interna). En el borde del embudo la proteína puede moverse entre diferentes estados *cuasi* degenerados energéticamente. Al ir cayendo por el embudo cada vez hay menos entropía (el diámetro del cono es más pequeño) y por lo tanto son accesibles menos estados, pero estos son más estables energéticamente. Al fin se llega a la forma plegada

donde la energía será óptima y la entropía más pequeña. Cuando una proteína se pliega, se mueve como un embudo, donde el diámetro del embudo da idea de la entropía de la cadena y la profundidad determina la energética del sistema. (Figura 2) (Mateu y Neira, 2004).

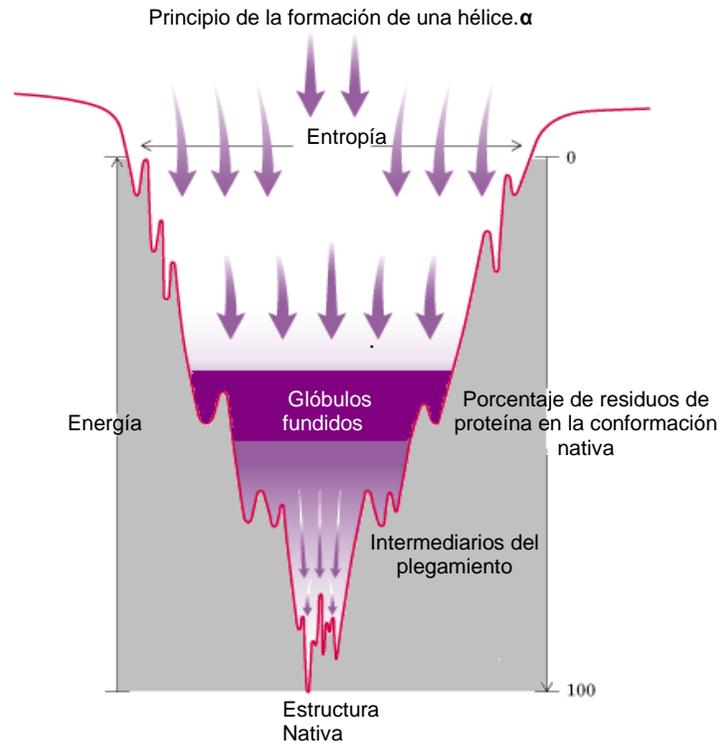


Figura 2.-Corte de un paisaje de energía del plegamiento de proteínas.

Modificado de: Mateu y Neira, 2004.

1.4 PLEGAMIENTO ANÓMALO DE LAS PROTEÍNAS.

Dobson (1999) determinaron que debido a la complejidad con la que se lleva a cabo el proceso de plegamiento de las proteínas, muchas veces, éste se puede ver afectado, provocando que se presenten anomalías que combinado con la disfunción celular pueden ser causantes de diversas enfermedades. La proteína afectada no lleva a cabo su función correctamente o no se secreta en la cantidad adecuada (Chávez-Cárdenas, 2002).

En este caso también se presentan errores del plegamiento que generan agregados fibrilares insolubles, conocidos como amiloides. El uso del término

amiloide en este grupo de enfermedades se debe al patólogo alemán R. Virchow, quien lo usó para referirse a ciertos depósitos hallados en muestras *postmortem* de órganos y tejidos. Estos depósitos reaccionan con el yodo, por lo que supuso se debían a la acumulación de sustancias del tipo del almidón. Aunque se ha descubierto que las partículas que se encuentran como agregados provienen de las proteínas, se sigue utilizando el término (Virchow, 1854).

1.4.1 ENFERMEDADES DEL PLEGAMIENTO ANÓMALO DE LAS PROTEÍNAS.

Dentro de este grupo se encuentran el Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob y la encefalopatía espongiforme bovina (síndrome de las vacas locas). Actualmente, no se tiene conocimiento de cómo afecta la presencia de fibras amiloides en estas patologías (Chávez-Cárdenas y col., 2002).

Existe un gran número de enfermedades relacionadas con los agregados proteicos, que también se han asociado a factores genéticos. Se han encontrado condiciones que favorecen la presencia de conformaciones no nativas de la proteína y que actúan como precursores de la formación de agregados amiloides (Uversky y col., 2001).

1.5 TRIOSAFOSFATO ISOMERASA.

La triosafosfato isomerasa (TPI) es una proteína homodimérica, de cadenas de 27 kDa, soluble, que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el D-gliceraldehído 3-fosfato (G3P), en la reacción 5 de la glucólisis (Knowles, 1991). Esta proteína es conocida en todos los organismos en donde ha sido buscada (Lolis y col., 1990).

La estructura secundaria de la TPI está formada por ocho hebras β que tienen alternancia con una o dos hélices α , la cadena polipeptídica se pliega de tal manera que forman una hoja β paralela formando una especie de barril (Banner y col., 1975).

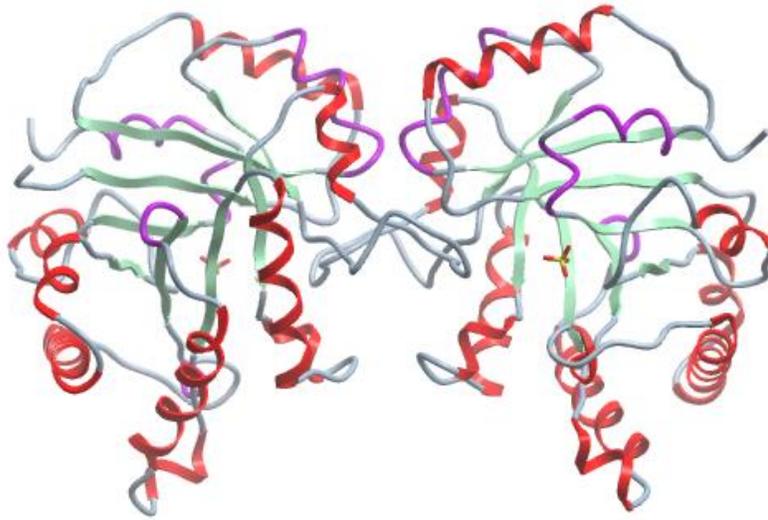


Figura 3. Estructura cristalográfica de la TPI de humano. Representación de los 2 monómeros de la TPI de humano. Las hélices α están representadas por espirales, las hebras β se muestran como listones.

Actualmente se conocen más de 1000 especies de TPI (Swissprot, 2008), de las cuales se tiene conocimiento de su estructura tridimensional las siguientes: *Gallus gallus* (pollo) (Banner y col., 1975), *Sacchararomyces cerevisiae* (Lolis y col., 1990) , *Trypanosoma brucei brucei* (Wierenga y col., 1991), *Escherichia coli* (Noble y col., 1993), *Homo sapiens sapiens* (humano) (Mande y col., 1994), *Bacillus stearothermophilus* (Delboni y col., 1995), *Plasmodium falciparum* (Velanker y col., 1997), *Vibrio marinus* (Álvarez y col., 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado y col., 1998), *Leishmania mexicana* (Williams y col., 1999), *Thermotoga maritima* (Maes y col., 1999), *Pyrococcus woei* (Walden y col., 2001), y *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero y col., 2002)) *Giardia lamblia* (Reyes-Vivas y col.,2007). (Citado en Nájera, 2003). Todas las TPI cuya estructura ha sido determinada hasta la fecha, son dímeros formados por dos subunidades idénticas que tienen un plegamiento de barril $(\beta/\alpha)_8$. Con la excepción de dos enzimas de arqueobacterias hipertermófilas reportadas como homotetrámeros de 100 kDa (Kohlhoff y col., 1996)

La estructura de la TPI es muy estudiada, ya que es la arquitectura más abundante entre las enzimas conocidas, ya que describen la posibilidad de dar origen a varios linajes de barriles (β/α)₈ (Jürgens y col., 2000; Soberon-Mainero, 2002).

1.5.1 DEFICIENCIA DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA.

La deficiencia de la TPI es un defecto recesivo autosómico, que es causante de anemia hemolítica y disfunción neuromuscular (Daar y col., 1986), los estudios han revelado que el desarrollo de la neurodegeneración es un proceso multifacético (Oláh y col., 2002). Además de provocar la muerte prematura en niños menores de 6 años (Hollán y col., 1993).

Existe una diferencia entre los niveles de DHAP y la actividad de la TPI en las deficiencias celulares, se ha encontrado que la deficiencia celular es causada por los altos niveles existentes de DHAP. El aumento se ve reflejado entre un 20 a un 60 % en la concentración de DHAP (Valentine y col., 1984; Rosa y col., 1985; Zanella y col., 1985; Orosz y col., 1996).

Se conocen algunas mutaciones en la enzima (Schneider y Cohen-Solai, 1996) dentro de las cuales se encuentran la mutación del Glu 104 por Asp, esta mutación aparentemente le confiere termolabilidad (Daar y col., 1986), la Gly 122 por Arg (Hollan y col., 1993). y Phe 240 por Leu (Chang y col., 1993) hacen a la enzima termolábil. Varios experimentos realizados con la proteína silvestre y la mutante Phe 240 Leu, presentaron cambios en la actividad de la proteína mutante de 30% con respecto a la proteína silvestre (Orosz y col., 2001). Otras mutaciones fueron las reportadas por Bardosi y colaboradores (1990) en Val 231 por Met, en donde se reportó la existencia de características clínicas de miopatía degenerativa e incremento en los niveles de glucógeno intracelular. Arya y colaboradores (1995) reportaron la mutación Ile 170 por Val, en donde se presentaron desórdenes neurológicos y se sugirió la alteración de la estructura de la enzima, presentando

una catálisis anormal, generando manifestaciones clínicas comunes de la deficiencia de TPI.

1.6 DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN.

Los procesos de renaturalización y desnaturalización pueden ser obtenidos de diversas formas, incluyendo un aumento o disminución de temperatura, así como de pH, o también mediante la adición o eliminación de agentes caotrópicos como lo son la urea o cloruro de guanidina (GuHCl). La modificación de las condiciones vera favorecido el estado N con respecto a las del estado D o viceversa, trayendo como consecuencia las reacciones de plegamiento o despleamiento de la TPI, en una o varias etapas.

Conforme se aumenta la concentración del agente desnaturizante, también aumenta la constante de velocidad de la reacción de despleamiento, en tanto que la energía libre entre el estado inicial y final del proceso sea lo suficientemente grande. La misma reacción se presenta para el proceso de plegamiento. El efecto de los agentes desnaturizantes es solvatar las cadenas laterales más hidrófobas (Mateu y Neira, 2004).

Se han realizado experimentos de desnaturalización (N-D) y renaturalización (D-N) en donde se ha observado la presencia de histéresis cinética, en especial en experimentos realizados con la TPI del conejo bajo presión hidrostática (Rietveld y Ferreira, 1996) así como en la TPI de levadura (ScTPI) utilizando a la temperatura (Benítez-Cardoza y col., 2001) y químicos como desnaturizantes (Nájera y col., 2003).

En otros experimentos realizados, no se ha reportado la presencia de intermediarios en la desnaturalización de la hTPI silvestre y se propone un modelo de dos estados $N \rightleftharpoons D$, donde N es el dímero nativo y D es el monómero desnaturizado (Mainfroid y col., 1996). Por otra parte, González-Torres (2007) encontró que la hTPI presentó histéresis cinética en la ruta $N \rightarrow D$, no siendo así

para la ruta inversa, además de sugerir la presencia de un intermediario utilizando como perturbador a la urea, después de 48h de renaturalización y proponiendo presencia de intermediario a las 24h de renaturalización en presencia de GuHCl.

1.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA (K_m y V_{max}).

Las enzimas son catalizadores proteicos que aceleran la velocidad de una reacción y que no se consumen durante el proceso. Otra propiedad de las enzimas, es su alto grado de especificidad, esto es, que solamente se cataliza la reacción en la que participan un sustrato o un grupo de sustratos con ciertas características químicas y geométricas comunes.

La cinética enzimática comienza con la velocidad inicial de reacción, la cual corresponde desde el punto de vista matemático, a la pendiente de la recta. Esta relación lineal se mantiene cuando el consumo de sustrato no va más allá de 5% de la concentración inicial. Sin embargo, con forme aumenta el tiempo, el sistema se desvía de este comportamiento lineal, esto se puede originar por que la concentración del sustrato disminuye, a que la enzima se inhibe con el producto o a la activación de la misma enzima conforme transcurre el tiempo.

Cuando la concentración de sustrato es muy grande, se determina la velocidad máxima de reacción, debido a que todas las enzimas tienen el sitio activo ocupado por una molécula de sustrato, por tanto aunque se aumente mas la concentración de éste, el numero de sitios activos sigue siendo el mismo, se dice entonces que la enzima esta saturada; por otro lado a muy bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción es inversamente proporcional a la concentración del sustrato, así conforme aumenta la concentración del sustrato (S), hay un incremento lineal en la velocidad de reacción.

La K_m tiene una relación inversa con la afinidad de la enzima por el sustrato, cuando la K_m es muy pequeña, la afinidad de la enzima por el sustrato es grande,

por lo que se alcanza una velocidad máxima a concentraciones bajas de sustrato; por otra parte, cuando existe una K_m muy grande, la afinidad de la enzima por el sustrato disminuye.

Por lo anterior se puede definir a la V_{max} como cualquier cantidad dada de enzima, como la velocidad inicial V_0 a las concentraciones de saturación del sustrato; en tanto que la K_m es una constante para cada enzima, y su importancia radica en que es un índice aproximado de la afinidad de la enzima con respecto a su sustrato (Peña-Díaz y col., 2002). La relación entre estos dos parámetros esta dada por la ecuación siguiente:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m [S]}$$

En donde:

V_0 = velocidad observada a una concentración dada de sustrato.

V_{max} = velocidad máxima a [S] saturante.

K_m = constante de Michaelis, expresada en molas/litro (concentración molar, o M).

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El interés en el tema del plegamiento anómalo de las proteínas se ha ido incrementando considerablemente, sabiendo que las enfermedades como el Alzheimer y Parkinson, entre otras, son causadas por este tipo de anomalías; la determinación del proceso cinético y termodinámico es todavía una incógnita, puesto que no se sabe con certeza el porqué las proteínas no cumplen con seguimiento exacto en cuanto a su ruta de plegamiento, además de mutaciones, causantes de diversas patologías ya establecidas, pero poco esclarecidas.

Es por ello, la importancia de tener el conocimiento de los parámetros cinéticos que presenta la TPI silvestre y mutada en la posición 104; el objetivo principal es obtener una purificación alta de la mutación Glu 104 Asp, además de que los parámetros cinéticos permitan ahondar en el conocimiento del comportamiento de la mutante con respecto a su similar silvestre.

La relación existente entre la nutrición y el estudio del comportamiento de la enzima es esencialmente el conocimiento de la interacción entre los nutrientes y la expresión de genes particulares, esto permitirá a largo plazo, profundizar en el efecto de los nutrientes en la expresión génica de enzimas.

3.- JUSTIFICACIÓN.

Actualmente se conocen diversas enfermedades derivadas del plegamiento anómalo de las proteínas que propician manifestaciones clínicas tales como anemias hemolíticas o enfermedades neurodegenerativas. La triosafosfato isomerasa es una enzima que se ve afectada por este tipo de anomalías, es por ello que resulta imprescindible conocer la o las razones por la cual surgen estos desórdenes conformacionales, ya que con esto se contribuirá no sólo al conocimiento científico de las posibles causas que ocasionan esta problemática, sino también ayudar a largo plazo a la implementación de vacunas, terapias, y/o tratamientos que coadyuven al manejo adecuado de las diversas enfermedades generadas por las mutaciones.

El resultado obtenido en el presente trabajo permitirá esclarecer de manera parcial, el conocimiento del comportamiento de la mutante elaborada, delimitando parámetros cinéticos que al ser comparados con los ya reportados por varios autores con respecto a la enzima silvestre, dará a conocer las bases del porque se presentan alteraciones tan graves en el ser humano que conllevan a un serie de problemáticas en la salud.

4.- OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Purificar y caracterizar parcialmente la mutante Glu 104 Asp de la triosafosfato isomerasa de humano.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Purificar la HTPI_{E104D} mediante métodos de cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico.
2. Determinar la reversibilidad de la HTPI_{E104D} por medio de desnaturalizantes químicos (urea y GuHCl).
3. Determinar los parámetros cinéticos de la HTPI_{E104D} (K_m y V_{max})

5.- METODOLOGÍA.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

El estudio de la mutante se llevo a cabo de la siguiente manera:

La purificación y expresión de la mutante se obtuvo mediante métodos de cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico, además de la elaboración de un gel de poliacrilamida para verificar la pureza de las fracciones obtenidas.

Los experimentos de reversibilidad fueron determinados a partir de mediciones espectrofluorométricas; el cálculo de los parámetros cinéticos y determinación de la concentración de proteína fueron obtenidos espectrofotométricamente.

La actividad catalítica fue determinada a partir de mediciones espectrofotométricas, utilizando como sustrato al D,L- gliceraldehído-3-fosfato.

5.1 EQUIPOS Y TECNICAS.

- Centrífuga refrigerada Beckman Avanti J-25-I
- Espectrofotómetro UV/Vis Agilent 8453.
- Espectrofluorómetro Shimadzu RFC530.1
- Columna superdex 200 de Pharmacia
- Columna mono Q 10/100 de intercambio aniónico de Pharmacia

Técnicas.

5.2 Construcción de la mutante Glu 104 Asp.

Agradecemos la ayuda y participación del Dr. Alejandro Sosa Peinado del Laboratorio de fisicoquímica e Ingeniería en proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM, por la elaboración de la mutante, la cual se llevo a cabo de la siguiente manera:

La sustitución del aminoácido Glutamato por Aspartato en la posición 104 se llevo a cabo por mutagénesis sitio dirigida utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la mutante se realizó una reacción de PCR con 200 µg del oligonucleótido mutagénico directo y T7 terminador y la mezcla de reacción para PCR a una concentración de MgCl₂ de 1.5 mM.

Se utilizó un termociclador de PCR a 94° C por 5 minutos; 30 ciclos de 45 segundos a 94° C, 45 segundos a 55° C y 1 minuto a 72° C y por último 10 minutos a 72° C.

Las mismas condiciones de tiempo y temperatura se utilizaron en una segunda reacción de PCR con 200 µg del oligonucleótido mutagénico complementario correspondiente y el promotor T7.

Con el DNA aislado, resultado de ambos PCRs para la mutante, se realizó la amplificación del gel completo (0.75 Kb más 0.350 Kb de secuencia del plásmido, 1.1 Kb) en una tercera reacción de PCR.

Los genes completos se secuenciaron para confirmar la mutación y verificar que no existían errores.

5.3 Expresión y purificación de la mutante Glu 104 Asp.

5.3.1 EXPRESIÓN

Se crecieron células de *Escherichia coli* (cepa BL21DE3), en donde se transformaron las células que contenían a la mutante, una vez transformadas se plaquearon en medio Luria Bertani (LB) con 100 µg/mL de ampicilina.

Se escogieron algunas colonias, el crecimiento se procedió, y se realizaron mediciones de absorbencia hasta obtener una $Abs_{600}=1$. En este momento se le adicionó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) como iniciador de la expresión, a una concentración final de 0.4 mM. Se dejó incubando en el cultivo durante 12 horas más (Mande y col., 1994)

5.3.2 ROMPIMIENTO

Se centrifugó el cultivo en una centrifuga refrigerada Beckman Avanti J-25-I, a 4500 rpm, a una temperatura de 13°C por 15 minutos.

Partiendo de 2 litros de medio de cultivo, que sobreexpresan la TPI de humano, se resuspendió el precipitado obtenido en 15 mL de amortiguador de extracción MES 25mM, EDTA 1 mM, DTT 1mM, fenilmetilsufonil fluoruro (PMSF) disuelto en 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

Las células se fragmentaron con 8 ciclos de ultrasonificación, 40 segundos con 1 minuto de descanso entre cada ciclo, para después centrifugarlas a 12,000 rpm a una temperatura de 4°C por 20 minutos y proseguir su purificación.

5.3.3 PURIFICACIÓN

La purificación de la TPI de humano se realizó principalmente combinando métodos de precipitación diferencial y cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico, basándose en los protocolos utilizados por Mande y colaboradores (1994).

El sobrenadante obtenido de la extracción se precipitó diferencialmente del 0 al 45% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (277 g/L). El precipitado se separó por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C.

El sobrenadante, se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 45 a 75% (210 g/L) y se resuspendió en aproximadamente 4 mL de amortiguador B que contenía TEA 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM; pH 7.6

Se dializó en 350 mL de este amortiguador, por 4 horas; se utilizó una bolsa de diálisis con corte en 10,000 Da; Después se dializó contra 600 mL de este amortiguador toda la noche.

La muestra se inyectó en una columna Superdex 200 de Pharmacia previamente equilibrada con el mismo amortiguador utilizando un sistema de ÄKTA-FPLC controlado con el software UNICORN 5.1, con colector de fracciones.

El eluido se separó en fracciones de 1 mL y se leyó la absorbencia a 280 nm con un espectrofotómetro; también, se midió la actividad catalítica de cada muestra.

Las fracciones con mayor actividad y proteína se juntaron y se inyectaron por una columna de intercambio aniónico Mono Q (Pharmacia), equilibrada con amortiguador B, utilizando un sistema de ÄKTA-FPLC, aplicando un gradiente lineal de 0-100 mM de NaCl para la elución.

La columna mono Q se equilibró con 80 mL de TED 10/1/1 pH 7.6; después con 40 mL del mismo amortiguador con NaCl 2 M, y después con 80 mL del amortiguador B.

Se realizó la corrida utilizando 120 mL de amortiguador B, con un incremento de 0-10% en concentración de NaCl (1 M), después se siguió con 20 mL con un incremento de 10-100% en la concentración de NaCl (1 M), 40 mL del amortiguador B al 100% de NaCl (1 M), y se terminó con 40 mL del mismo amortiguador sin NaCl.

Se analizaron las fracciones midiendo la actividad enzimática, y se juntaron las de mayor actividad, se midió la absorbencia a 280 nm. Las de mayor actividad se concentraron en un tubo de ultrafiltración Amicon Ultra-4, con corte en 10,000 PM, el cual se centrifugó por 8 min a 22°C.

De los tubos que contenían la proteína ya purificada y activa, se tomaron las fracciones 9-12 para correrlas en el gel.

El grado de pureza se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés).

El gel de poliacrilamida se elaboró de la siguiente manera (Shägger y von Jagow, 1987).

Se preparó el gel de electroforesis al 12% de poliacrilamida a un volumen de 10 mL, esto fue: 3.3 mL de H₂O, 4 mL de acrilamida al 30%, 2.5 mL de Tris 1.5M pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 0.1 mL de persulfato de amonio al 10%, 0.012 mL de TEMED.

Se aplicó alcohol isopropílico para dejar una superficie horizontal en el fondo de la cámara, una vez logrado esto se desechó el alcohol y se enjuagó con agua

destilada, al vaciar el gel concentrador se colocó el peine separador inmediatamente.

Se prepararon posteriormente, 3 mL de gel concentrador al 5%, esto es, 2.1 mL de H₂O, 0.5 mL de acrilamida al 30%, 0.38 mL de Tris 1.0M pH 6.8, 0.03 mL de SDS al 10%, 0.006 mL de TEMED.

Se colocaron 30 µL de cada muestra y del marcador, adicionando 30 µL de amortiguador a cada una con desnaturalizante preparado de la siguiente forma: 4 mL de SDS al 10%, 1.0 mL de 2-mercaptoetanol, Azul de bromofenol, 2.5 mL de Tris base, 2.0 mL de glicerol, 10mL de H₂O.

Se dejaron hervir por 5 minutos los tubos que contenían las muestras a correr en el gel antes de colocarlas en los carriles. En cada carril se colocaron los 60 µL correspondientes para cada tubo y el carril del marcador con TPI silvestre.

La base de la cámara se llenó con amortiguador de corrimiento preparado con: Glicina, Tris base, SDS y H₂O. Se conectó a una fuente de poder a 125 mV.

El gel se fijó con ácido acético al 10% durante 1h, posterior a esto se tiñó con azul brillante de Coomasie por 24 h y se decoloró con ácido acético.

5.4 Actividad catalítica de la mutante Glu 104 Asp.

La actividad catalítica se siguió espectrofotométricamente mediante la disminución en la absorbencia a 340 nm debido a la oxidación del NADH, determinada a 25 ± 1°C en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4, utilizando D,L- gliceraldehído-3-fosfato como sustrato.

Los ensayos de actividad catalítica se realizaron a partir de 300 μL de $\text{HTPI}_{\text{E104D}}$, 40 μL de G3P, 20 μL de NADH, 2 μL de $\alpha\text{-GDH}$, 638 μL de TED 100/10/1 pH 7.4 en un volumen final de 1 mL (Nájera, 1997).

Los parámetros cinéticos para la mutante $\text{HTPI}_{\text{E104D}}$, se obtuvieron ajustando los datos a la siguiente ecuación:

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m [S]}$$

5.5 Mediciones espectroscópicas de la mutante Glu 104 Asp.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorómetro (Shimadzu RFC530). La temperatura de las celdas fue de $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Para los espectros de fluorescencia se excitó a 280 nm (ancho de banda 4 nm) y se colectó la emisión de 300-400 nm (ancho de banda 8 nm). Se utilizaron celdas de cuarzo de 0.4 cm de paso de luz.

5.6 Reversibilidad.

Los experimentos se realizaron a partir de un volumen final de 500 μL de $\text{TPI}_{\text{E104D}}$ en concentraciones de 50 y 89 $\mu\text{g/mL}$, en presencia de urea. Y de 100 $\mu\text{g/mL}$ utilizando como perturbante a la GuHCl .

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 PURIFICACIÓN DE LA MUTANTE GLU 104 ASP.

La purificación de la mutante, se realizó basándose principalmente en el método utilizado por Mande y colaboradores (1994), pero con modificaciones durante el proceso. Se obtuvieron 18 mL de sobrenadante después de la sonicación de las células; el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio y se resuspendió en amortiguador TED 10/1/1 pH 7.6, en donde se obtuvo un volumen total de 2.48 mL; este sobrenadante se inyectó en la columna superdex 200 y acoplado al sistema AKTA-FPLC, se recolectaron fracciones de 2.4 mL; De estas muestras se midió tanto la actividad como las absorbencias a 280 nm (figura 4).

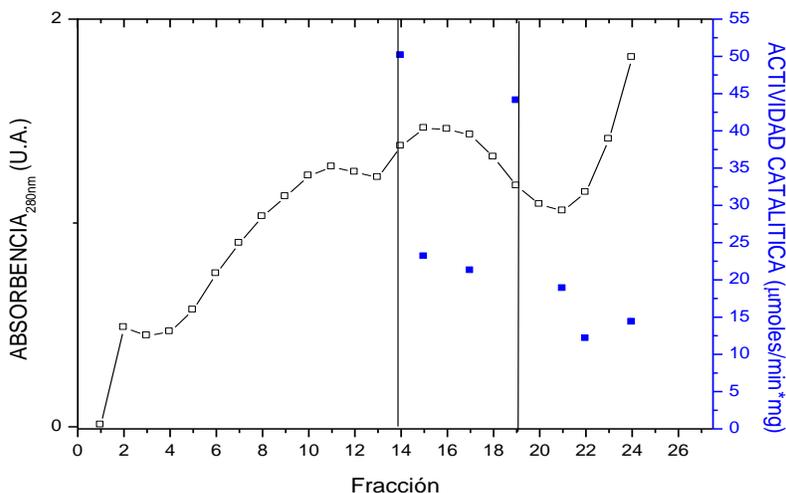


Figura 4.- Cromatografía de exclusión.-absorbencias (-□-) y actividad específica (-■-) de muestras inyectadas en la columna superdex 200. Las muestras de mayor absorbencia y actividad específica se presentaron en las fracciones 14-19 (indicados entre las líneas verticales paralelas).

Las muestras obtenidas en los tubos con mayor actividad en la columna superdex, se inyectaron en una columna mono Q de intercambio iónico, en el sistema AKTA-FPLC, y se recolectaron fracciones de 1.5 mL; de estas muestras, se midió la actividad y las absorbencias de los tubos, en donde se presentó la mayor actividad en las fracciones 14-19 (figura 5).

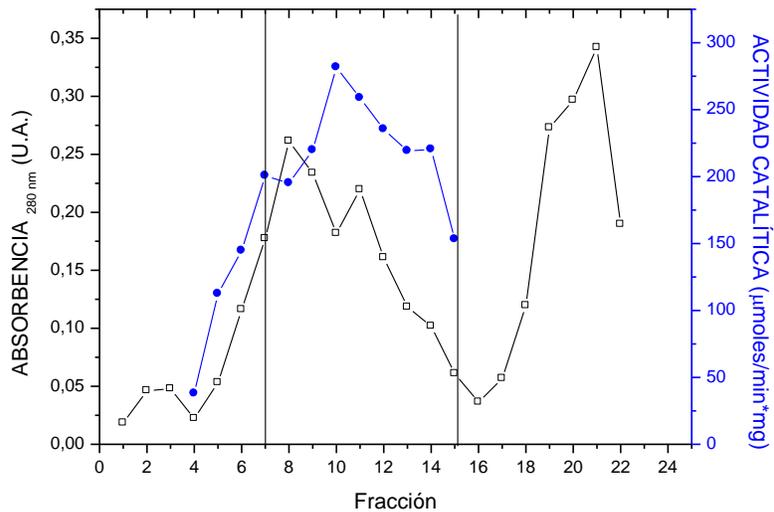


Figura 5.- Cromatografía de intercambio iónico.- absorbencias (-□-) y actividad específica (-●-) de muestras inyectadas en la columna mono Q. la mayor actividad y absorbencia se presentaron en las fracciones 7-15 (indicados entre las líneas verticales paralelas).

En la figura se presenta tanto la actividad específica de las muestras como sus respectivas absorbencias, en donde los picos más altos de actividad se encuentran en las fracciones 9-14, y aunque la absorbencia indique poca concentración de proteína, es necesario tomar en cuenta los dos parámetros, para obtener el mejor rendimiento de la purificación.

Para verificar la pureza de la enzima obtenida, se realizó un gel de poliacrilamida, se tomó una muestra de los tubos que presentaron mayor actividad y absorbencia, después de este procedimiento se comprobó que las enzimas más puras se encontraban en las fracciones 10,11 y 12. El carril 1, corresponde al marcador de TPI, y los carriles 2, 3, 4, corresponden a las fracciones 10, 11, y 12, en donde se puede observar que todos los carriles llegan a la misma distancia del marcador, y no presentan impurezas (Figura 6).

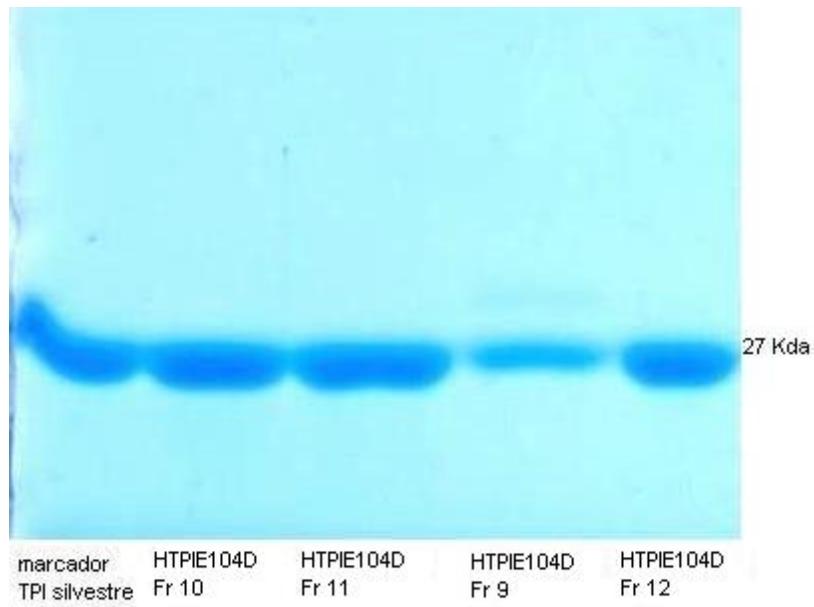


Figura 6.- Gel de poliacrilamida. El carril 1, muestra el marcador de TPI, el carril 2, carril 3 y carril 5 corresponden a las fracciones 10, 11 y 12 de la TPI_{E104D}, el carril 4 corresponde a la TPI_{E104D} de la fracción 9 obtenida después de la elución en la columna mono Q de intercambio iónico.

Se reconcentraron las muestras obtenidas en las fracciones 10, 11 y 12, en un tubo Amicon con corte en 10 KDa; la fracción 9 presento impurezas, por tanto no fue reconcentrada con las demás muestras. Para obtener la concentración total de la proteína se utilizó un $\epsilon = 1.33$ (Téllez y col., 2002).

En comparación con el proceso de purificación de la enzima en su forma silvestre (González-torres, 2007), se nota una diferencia significativa en dos aspectos, la obtención de un porcentaje más elevado de pureza de la mutante, y el concentración final de la enzima.

6.2 REVERSIBILIDAD.

El proceso de reversibilidad de la proteína se llevó a cabo para determinar que tan eficaz resulta la recuperación de la enzima cuando es sometida a un proceso de desnaturalización y renaturalización, utilizando como perturbantes a la urea y al GuHCl. Se midió la fluorescencia y la actividad específica, a diferentes concentraciones de enzima.

6.2.1 ESPECTROS DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA.

La intensidad de fluorescencia obtenida a las 24 horas con una concentración de enzima de 50 $\mu\text{g/mL}$, muestra que alcanzó un porcentaje de renaturalización del 69% con respecto a su enzima nativa utilizando como desnaturalizante a la urea (Figura 7).

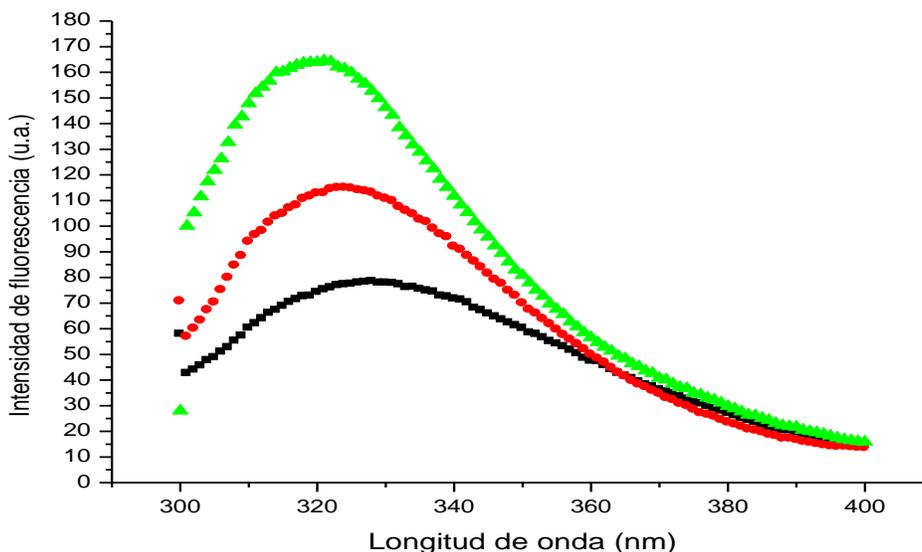


Figura 7.- Espectros de fluorescencia de la enzima HTPI_{E104D} a 24 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■), enzima mutante nativa (●) y la enzima mutante nativa con concentración de urea residual de 80 mM (▲).

Esta figura presenta el proceso de renaturalización después de 24 horas de incubación, donde se aprecia poco incremento de la intensidad de fluorescencia

de la enzima renaturalizada con respecto a su proteína nativa y a la enzima nativa con urea residual. La enzima mutante renaturalizada alcanzó la longitud de onda de máxima emisión a 328 nm; en tanto que la enzima mutante nativa, lo alcanzó en 324 nm, a diferencia de la enzima mutante con urea residual que presenta su punto máximo en 321 nm.

La intensidad de fluorescencia obtenida a partir de una concentración de 50 µg/mL de enzima a las 48 horas obtuvo un porcentaje de renaturalización de 75% de la proteína renaturalizada con respecto a la nativa (figura 8).

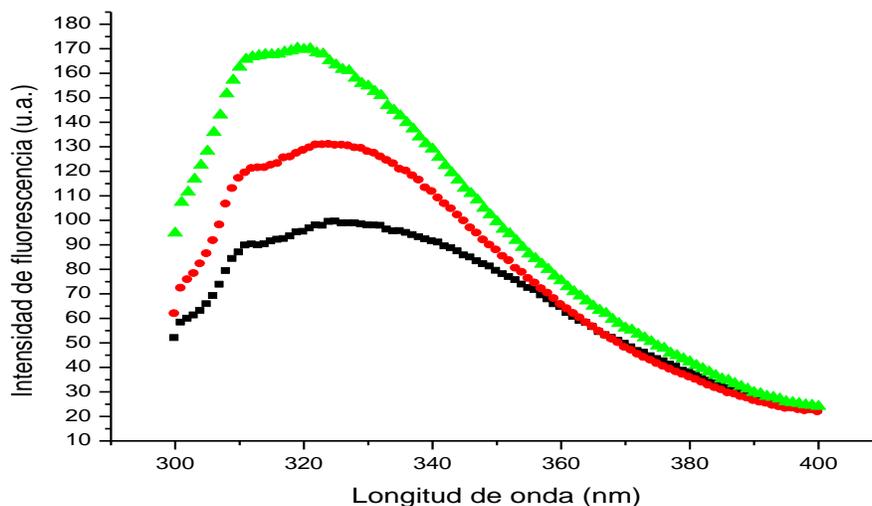


Figura 8.- Espectros de fluorescencia de la enzima HTPI_{E104D} a 48 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■) y de enzima mutante nativa (●) y la enzima mutante nativa con concentración de urea residual de 80 mM (▲).

Esta figura muestra el espectro de fluorescencia de renaturalización después de 48 horas de incubación, donde se nota un incremento de la intensidad de fluorescencia de la enzima renaturalizada con respecto a su proteína nativa. Los porcentajes se obtuvieron tomando en cuenta a la enzima nativa, sin el desnaturizante residual. Se puede apreciar que tanto la enzima mutante renaturalizada como la enzima mutante nativa, alcanzaron su longitud de onda de

máxima emisión en 324 nm, a diferencia de la enzima mutante con urea residual que presenta su punto máximo en 322 nm.

La intensidad de fluorescencia de la enzima a una concentración de 50 µg/mL a 72 horas, presenta un porcentaje del 76% de renaturalización de la enzima con respecto a su nativa (figura 9).

El espectro de fluorescencia presenta una mayor intensidad en la mutante nativa que contiene la urea residual, con lo que se puede observar una mayor renaturalización con respecto a la nativa sin urea y a la enzima renaturalizada. Esto indica que el residuo de urea que se presenta después de la renaturalización, puede alterar la medición de espectros de fluorescencia.

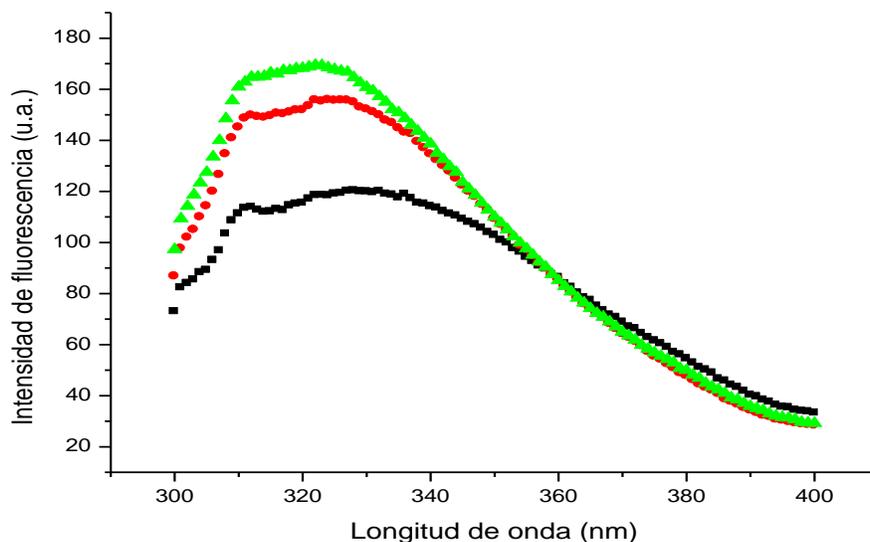


Figura 9.- Espectros de fluorescencia de la enzima HTPI_{E104D} a 72 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■) y de enzima mutante nativa (●) y la enzima mutante nativa con concentración de urea residual de 80 mM (▲).

En estos experimentos, se determinó que la enzima presenta su máximo punto de renaturalización a las 48 y 72 h, alcanzando un porcentaje de 75 % en promedio.

Reversibilidad a 89 µg/mL (Urea).

La intensidad de fluorescencia obtenida a las 24 horas con una concentración de enzima de 89 $\mu\text{g/mL}$, muestra que alcanzó un porcentaje de 74% de renaturalización de proteína con respecto a su enzima nativa utilizando como desnaturante a la urea. (Figura 10).

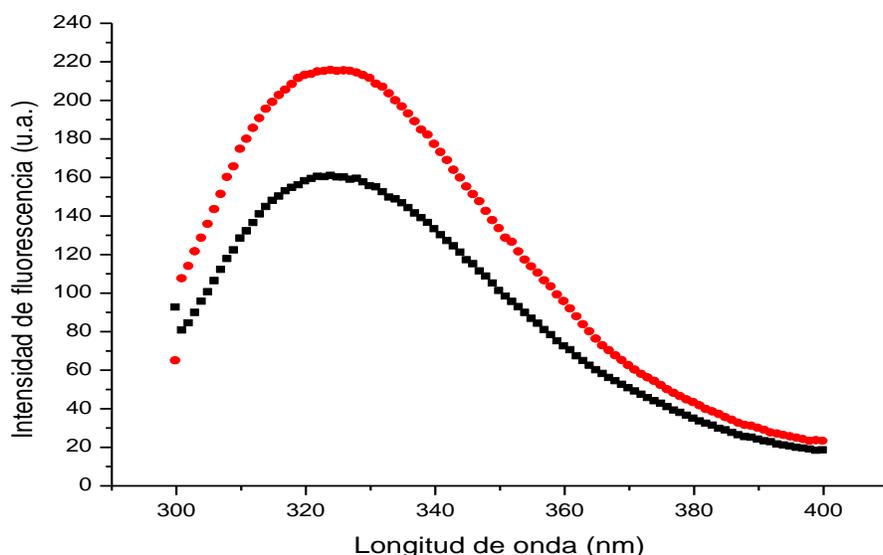


Figura 10.- Espectros de fluorescencia de la enzima HTPI_{E104D} a 24 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■), enzima mutante nativa (●).

El porcentaje de renaturalización después de 24 horas de incubación de la proteína mutante HTPI_{E104D}, con respecto a su enzima nativa, alcanzó su longitud de onda de máxima emisión a 324 nm para ambas muestras. La estructura de la enzima se ve modificada cuando regresa a su estado renaturalizado, lo que ocasiona que los tirptofanos no emitan la misma señal de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia obtenida a las 48 horas con una concentración de enzima de 89 $\mu\text{g/mL}$, muestra que alcanzó un porcentaje de 83% de renaturalización de proteína con respecto a la enzima nativa (Figura 11).

Esta figura muestra el porcentaje de renaturalización después de 48 horas de incubación de la proteína mutante HTPI_{E104D}, con respecto a su enzima nativa,

alcanzando su λ_{max} a 324 nm para ambas muestras, lo que representa una recuperación óptima en el proceso de renaturalización, con respecto a su forma nativa.

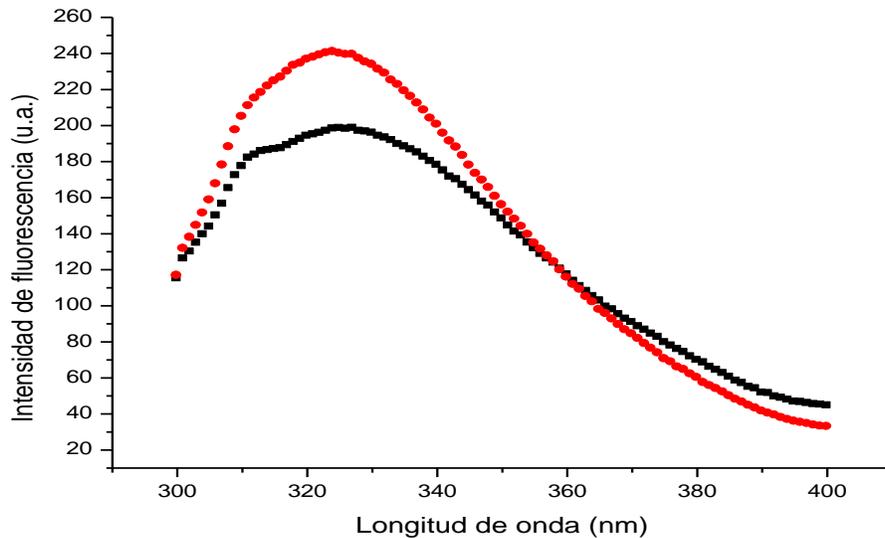


Figura 11.- Espectros de fluorescencia de la enzima HTPI_{E104D} a 48 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■), enzima mutante nativa (●).

La intensidad de fluorescencia obtenida a las 72 horas con una concentración de enzima de 89 $\mu\text{g/mL}$, presentó un porcentaje de recuperación del 94% de renaturalización de proteína con respecto a la enzima nativa (Figura 12).

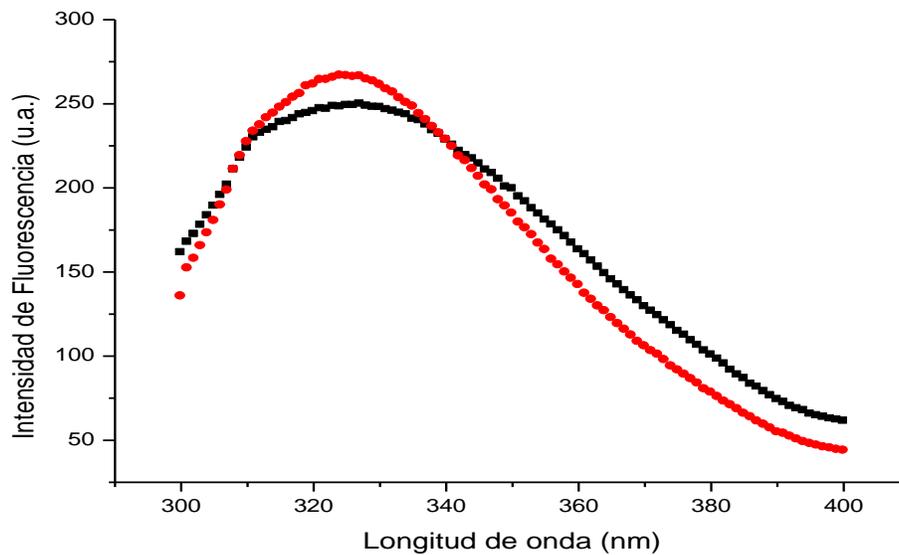


Figura 12.- Espectros de fluorescencia de la enzima HTPI_{E104D} a 72 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■), enzima mutante nativa (●).

Esta figura muestra que se obtuvo una longitud de onda de máxima emisión de 324 nm para ambas muestras. Se puede apreciar, que la renaturalización de la enzima mutante_{E104D}, utilizando como desnaturizante a la urea, el tiempo máximo de recuperación es a las 72 h, utilizando concentraciones altas de 50 y 89 µg/mL (figuras 7 y 10) para elevar el porcentaje de renaturalización.

Reversibilidad (GuHCl).

La intensidad de fluorescencia obtenida a las 24 horas con una concentración de enzima de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó un porcentaje de renaturalización de 133% con respecto a la enzima nativa utilizando como desnaturante a la GuHCl. (Figura 13).

Esta figura muestra el porcentaje de renaturalización después de 24 horas de incubación de la proteína mutante $\text{HTPI}_{\text{E104D}}$, con respecto a su enzima nativa, y la proteína nativa con GuHCl residual de 60mM, alcanzando su longitud de onda de máxima emisión a 323 nm para las muestras nativas y 320 nm para la renaturalizada.

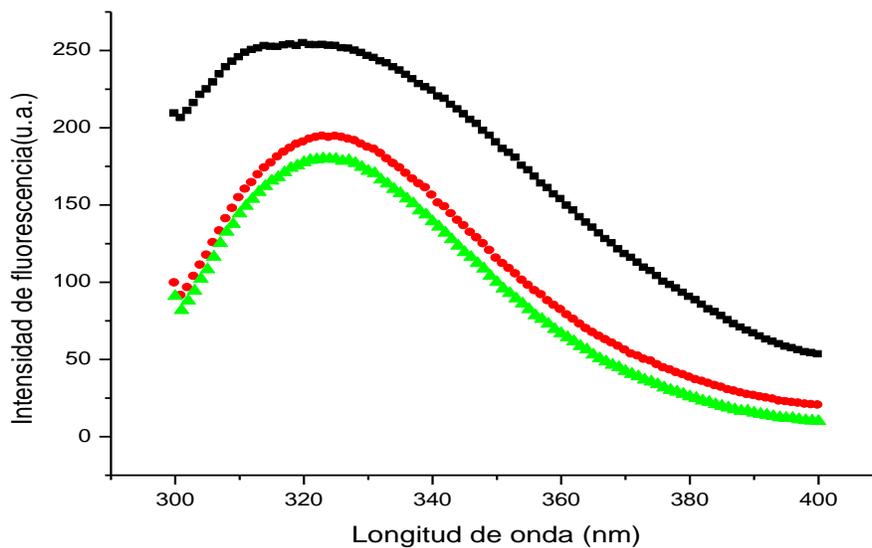


Figura 13.- Espectros de fluorescencia de la enzima $\text{HTPI}_{\text{E104D}}$ a 24 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■) y de enzima mutante nativa (●) y la enzima mutante nativa con concentración de GuHCl residual de 60 mM (▲).

La intensidad de fluorescencia obtenida a las 48 horas con una concentración de enzima de 100 $\mu\text{g/mL}$, presentó un porcentaje de renaturalización de 129% con respecto a la enzima nativa (Figura 14).

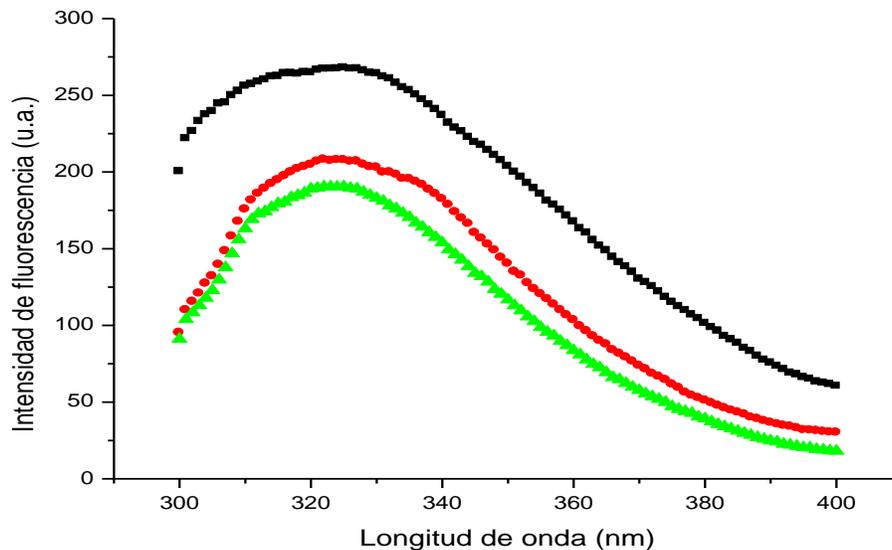


Figura 14.- Espectros de fluorescencia de la enzima HTPI_{E104D} a 48 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■) y de enzima mutante nativa (●) y la enzima mutante nativa con concentración de GuHCl residual de 60 mM (▲).

La proteína nativa con GuHCl residual de 60mM, alcanzó su longitud de onda de máxima emisión a 324 nm para las muestras nativas y 325 nm para la renaturalizada. Si bien no existe una diferencia en cuanto al las longitudes de onda con respecto a lo obtenido a las 24h, se presenta una disminución en el porcentaje de renaturalización.

La intensidad de fluorescencia obtenida a las 72 horas con una concentración de enzima de 100 $\mu\text{g/mL}$, alcanzó un porcentaje de 113% de renaturalización de proteína con respecto a la enzima nativa (Figura 15).

Esta figura muestra una mayor recuperación de la proteína mutante_{E104D} renaturalizada, con respecto a su enzima nativa y a la proteína con GuHCl residual, siendo su longitud de onda de máxima emisión a 324 nm para las tres

muestras. Se puede apreciar, que en la renaturalización de la enzima mutante E_{104D} , utilizando como desnaturalizante a la GuHCl, se deben utilizar concentraciones altas (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para elevar el porcentaje de renaturalización. En tanto que el tiempo de recuperación ideal es de 24 h (figura 11) ya que es donde se logro el mayor porcentaje de renaturalización con respecto a los otros tiempos.

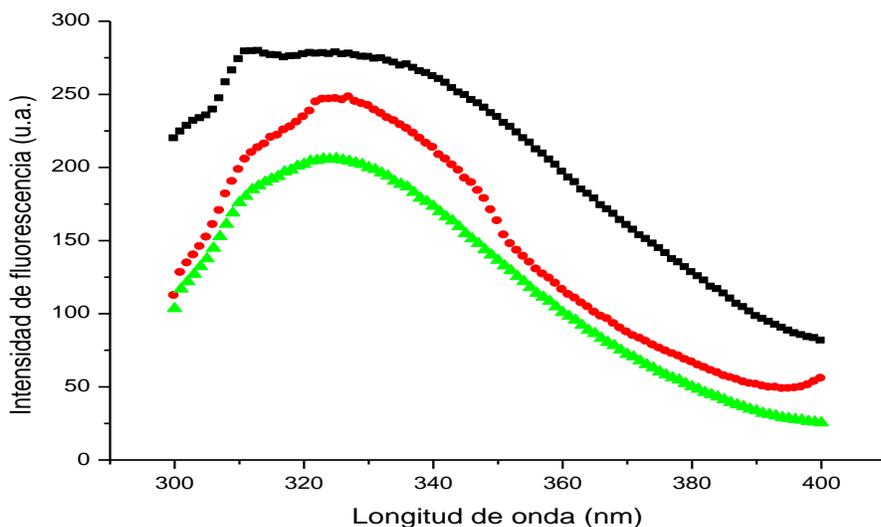


Figura 15.- Espectros de fluorescencia de la enzima HTPI E_{104D} a 72 horas de su renaturalización. Muestras de la enzima mutante renaturalizada (■) y de enzima mutante nativa (●) y la enzima mutante nativa con concentración de GuHCl residual de 60 mM (▲).

6.2.2 ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA HTPI_{E104D}.

En estos experimentos únicamente se utilizó como desnaturalizante a la GuHCl, a una concentración de 6 M en la desnaturalización (figura 16). Se comprobó que la urea, inactivó a la enzima y se obtuvieron porcentajes de actividad por debajo del 2%.

La actividad específica de la mutante HTPI_{E104D}, se midió a una concentración de proteína de 5 µg/mL, a diferentes tiempos, dichos experimentos dieron como resultado final un porcentaje de 69.43% de actividad a un tiempo de renaturalización de 24 h.

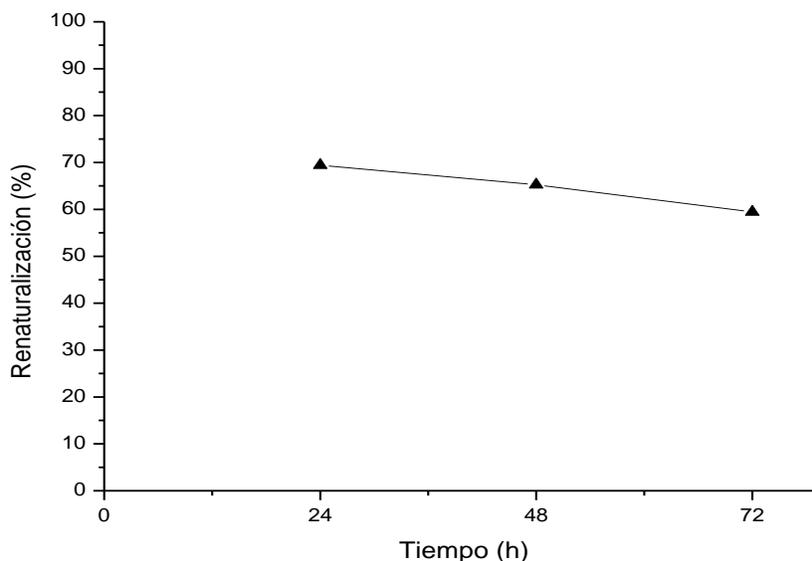


Figura 16.- Porcentaje de actividad catalítica.- actividad de la mutante HTPI_{E104D} a diferentes tiempos.

Debido a los porcentajes obtenidos para la actividad catalítica, se estableció que, la concentración de 5 µg/mL, además del tiempo de renaturalización de 24 h, y el GuHCl como agente desnaturalizante, fueran las condiciones utilizadas para el cálculo de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .

En experimentos anteriores, se obtuvieron resultados de reversibilidad muy parecidos a los encontrados en este trabajo, González-Torres (2007) encontró que para la HTPI silvestre, el tiempo de renaturalización era de 24 h para GuHCl y de 48 h utilizando a la urea como desnaturizante, en tanto que Nájera (1997) obtuvo el tiempo mas óptimo de renaturalización en 72 h, utilizando a la GuHCl como desnaturizante, para la enzima TPI de *Saccharomyces cerevisiae*; y para el 2003, el mismo autor, refiere los datos de renaturalización a 24 h para GuHCl y 48 h para la urea, utilizado en la misma enzima.

6.3 DETERMINACION DE K_m Y V_{max} DE LA HTPI_{E104D}.

Los parámetros cinéticos para la mutante HTPI_{E104D}, se obtuvieron aumentando la concentración de G3P para determinar la velocidad máxima (V_{max}) y la K_m . De este experimento se realizó la comparación de los comportamientos entre la enzima nativa y la renaturalizada. El valor de la V_{max} y K_m para la mutante nativa fueron de $60.38 \pm 2.12 \mu\text{mol/ min}\cdot\text{mg}$ y de $0.76 \pm 0.07 \text{ mM}$ respectivamente. Mientras que para la mutante renaturalizada los valores obtenidos fueron para V_{max} y K_m de $76.15 \pm 2.49 \mu\text{mol/ min}\cdot\text{mg}$ y de $0.95 \pm 0.08 \text{ mM}$ respectivamente (figura 17).

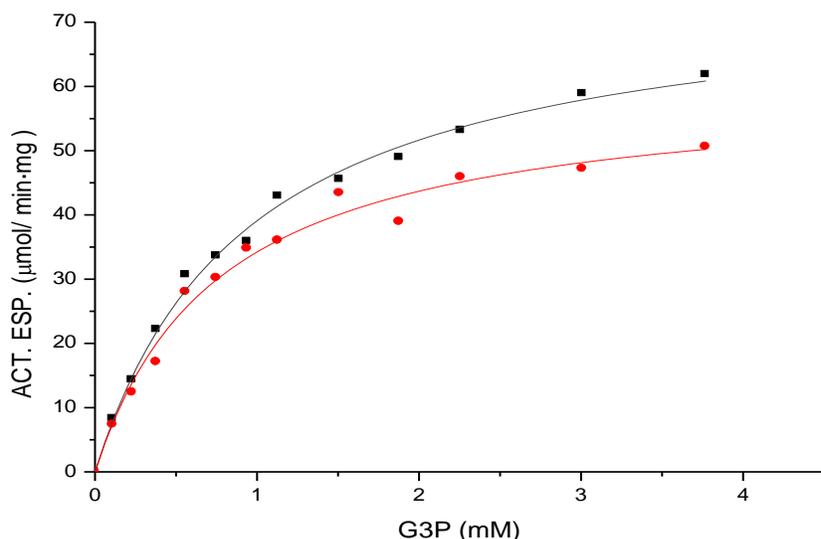


Figura 17.- Determinación de los parámetros cinéticos de la HTPI_{E104D}. Determinación de la K_m y V_{max} de la HTPI_{E104D}, para la proteína nativa (-●-) y la proteína renaturalizada (-■-).

En presencia de GuHCl, utilizando una concentración de $5 \mu\text{g/mL}$ de la enzima, la proteína presenta casi el mismo comportamiento para la mutante nativa con respecto a su proteína mutante renaturalizada.

Se han estudiado los parámetros cinéticos de TPI de diferentes especies en las que sus características cinéticas son muy similares. Entre los resultados obtenidos

para diferentes TPI se encuentra el caso de la TPI de pollo y la de *T. brucei*, en donde sus parámetros cinéticos son casi idénticos (Lambeir y col., 1987).

También se presentan algunos datos obtenidos para la k_m y V_{max} de TPI de distintas especies, en donde se nota una mínima diferencia en los valores de la K_m , pero un notable cambio en los resultados de la V_{max} , con respecto a los obtenidos en este trabajo (Tabla 1).

Tabla 1.-Comparación de la K_m y V_{max} de TPI de diferentes fuentes.

| TPI diferentes especies. | Nativa G3P K_m (mM) | Renaturalizada G3P K_m (mM) | V_{max} nativa ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) | V_{max} renaturalizada ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) | Referencia. |
|--------------------------|---|--|---|---|---|
| <i>S. cerevisiae</i> | 1.22 \pm 0.05 0.62 \pm 0.05 0.77 \pm 0.08 | No reportado 1.86 \pm 0.12 0.72 \pm 0.09 | 11,53 \pm 979 | 8148 \pm 637 | Lambeir y col., 1987 Sun y col., 1992 Nájera., 1997 |
| Conejo | 0.39 \pm 0.05 0.43 \pm 0.06 | No reportado 1.40 \pm 0.28 | No reportado | No reportado | Lambeir y col., 1987 Sun y col., 1992 |
| Pollo | 0.39 0.47 | No reportado | No reportado | No reportado | Plaut y Knowles, 1972 * Putman y col., 1972* |
| Humano | 0.43 0.49 0.48 \pm 0.08 0.74 \pm 0.1 | No reportado 0.58 \pm 0.04 No reportado | 2076 \pm 99 7080 \pm 415 | 1455 \pm 38 No reportado | Sawyer y Gracy, 1975 Mainfroid y col., 1996 González-Torres., 2007 Rodríguez-A. y col.2008 |
| HTPIE _{104D} | 0.70 \pm 0.15 0.76 \pm 0.07 | No reportado 0.95 \pm 0.08 | 6600 \pm 354 60.38 \pm 2.12 | No reportado 76.15 \pm 2.49 | Rodríguez-A. y col.2008 Resultados obtenidos en el presente trabajo |

*Tomado de Lambeir y col., 1987

Los resultados obtenidos por Rodríguez-Almazán y colaboradores (2008) muestran una V_{\max} al menos 100 veces mayor con respecto al valor obtenido en este trabajo, para la HTPI_{E104D}. La alteración de los resultados obtenidos por el autor, pueden estar relacionados a la forma en la cual se llevó a cabo su purificación, mediante la adición de “colas de histidina”, que se sintetizan con la enzima, pudiendo provocar cambios o modificaciones en la medición de la actividad catalítica.

Orosz y colaboradores (1996) obtuvieron datos de V_{\max} para la mutante Phe 240 Leu de 31.5 ± 1.0 y 40.0 ± 1.7 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ encontrados en una familia húngara, en donde los hijos (gemelos) son portadores de la mutación. Esto refleja que las mutaciones de la TPI reducen de manera significativa este parámetro cinético, con respecto a la enzima silvestre.

7.- CONCLUSIONES.

- Se obtuvo un porcentaje mayor al 98% de purificación de la enzima mutante HTPI_{E104D}.
- Al realizar los experimentos de fluorescencia, se comprobó que las mejores condiciones para obtener una mejor reversibilidad, son concentraciones altas de proteína (50 y 89 µg/mL para urea y 100 µg/mL para GuHCl).
- La HTPI_{E104D} mostró una mayor reversibilidad en presencia de la GuHCl como agente desnaturizante, en comparación con la reversibilidad presentada con urea, ya que le permite obtener un mayor porcentaje de renaturalización (130%).
- La HTPI_{E104D} se inactivó en presencia de la urea como desnaturizante, aún después de mostrar una buena un porcentaje elevado de renaturalización (mayor al 92%) en experimentos de fluorescencia para el mismo perturbante.
- Al utilizar una concentración pequeña de proteína en la medición de actividad catalítica, se pudo comprobar que esta condición favoreció a un aumento considerable de este parámetro, con respecto a los resultados obtenidos con concentraciones mayores.
- La actividad específica obtenida en este trabajo resultó mayor para la enzima renaturalizada con respecto a la nativa, al utilizar como desnaturizante al GuHCl.
- La K_m obtenida para la mutante HTPI_{E104D}, no presenta cambios significativos con respecto a resultados obtenidos por otros autores, en específico con las K_m de la HTPI silvestres, por tanto la mutación no afecta a la enzima en cuanto a este parámetro. Sin embargo, existe una disminución considerable en el parámetro de V_{max} .

8.- PERSPECTIVAS.

Para conocer mas acerca del comportamiento de la mutante E104D de la TPI de humano, es necesario estudiar más a fondo su comportamiento de plegamiento a través de otros estudios específicos que permitirán esclarecer cual es realmente el cambio en las características estructurales y cambios que se presenten en distintas condiciones.

Se propone realizar experimentos de estudio al equilibrio con el fin de esclarecer la ruta de plegamiento de la HTPI_{E104D}; De igual forma se deben elaborar experimentos de Radio de Stokes para corroborar si existen intermediarios dentro del proceso de renaturalizacion y desnaturalizaron de la enzima; además de otros estudios para determinar los parámetros termodinámicos de la mutante.

9.- BIBLIOGRAFÍA:

- Álvarez, M., Zeelen, J. P. Mainfroid, V., Reintier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. y Maes, D. (1998). Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **273**: 2199-2206.
- Arya, R., Lalloz, MRA., Bellingham, AJ., y Layton, DM. (1995). Molecular pathology of human triosephosphate isomerase. *Blood* **86**(1): 585a.
- Banner, D.W., A.C. Bloomer. G.A. Petsko., D.C. Phillips. C.I. Pogson., I. A. Wilson. P. H. Corran., A. J. Furth., J. D. Milman. R. E. Offord., J. D. Priddle y Waley, S.G. (1975). Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**:609-614.
- Bardosi, A., Eber, SW., Hendrys, M., y Pekrun, A. (1990). Myopathy with altered mitochondria due to a triosephosphate isomerase (TPI) deficiency. *Acta Neuropathologica* **79**: 387-394.
- Benítez-Cardoza, C. G., Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana. A. (2001). Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* **40**: 9049-9058
- Cháñez-Cárdenas, M. E., Cisneros, D., Yauner, L., Becerril, B., y Fernández-Velasco, D. A. (2002). Enfermedades relacionadas al plegamiento anómalo de las proteínas. *Mensaje bioquímico* **26**:73-97.
- Cháñez-Cárdenas, M. E. (2002). Caracterización del patrón de desplegamiento de la triosa fosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma brucei* con urea y cloruro de guanidinio. *Tesis de Doctorado*. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.
- Cháñez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G. y Pérez-Montfort, R. (2002). Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of

intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* **399**, 117-129

- Chang, M.-L., Artymiuk, P. J., Wu, X, Hollan, S., Lammi, A. y Maquat, L. E (1993). Human triosephosphate isomerasa deficiency resulting from mutation of phe-240. *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 1260-1269.
- Chitti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. y C. M. Dobson (1999). Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci* **96**: 3590-3594.
- Daar, I. O., Artymiuk, P. J. Phillips, D. C. y Maquat, L. E. (1986). Human triosephosphate isomerase deficiency: a single amino acid substitution results in a thermolabile enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 7903-7907.
- Delboni, L. F., S. C. Mande, F. Rentier-Delrue, V. Mainfroid, S. Turley, F. M. D. Vellieux, J. A. Martial y Hol, W. G. J. (1995). Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.* **4**: 2594-2604.
- Peña-Díaz, A., Arroyo-Bogovich, A., Gómez-Puyou, A. y Tapia, R. (2002). Las enzimas: aceleradores de reacciones. En: *Bioquímica* (4ª Ed) Limusa editores. México D.F. pp: 194-202.
- Dobson. C. M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in biochemical sciences* **24**: 329-332.
- Fernández-Velasco, D. A. (1995). Plegamiento de proteínas. *BEB* **14**(2):5-10.
- Fernández-Velasco D. A. (2002). Estructura y propiedades de las proteínas. En: *Bioquímica de laguna*. (5ª Ed) El Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F. pp: 109-151.
- Gómez-Moreno, C. C. y Sancho, S. J. (2004). Plegamiento de proteínas y enfermedades relacionadas. En: *Estructura de Proteínas*. (1ª Ed) Ariel, España. pp: 201-231.

- González-Andrade, M., Silva, D., Hernández, H., Vázquez, E., y Sosa, P. (2005). La estructura y visualización molecular de las proteínas. *Mensaje bioquímico* **29**:157-180.
- González-Torres, L. (2007). Caracterización del patrón de plegamiento y asociación de la triosafosfato isomerasa de humano. *Tesis de licenciatura. UAEH.*
- HAPB. Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech. (2002). *Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography, Reversed Phase Chromatography*, Sweden.
- Hollán, S., Fujii, H., Hirono, A., Hirono, K., Karro, H., Miwa, S., Harsanyi V., Gyodi, E. y M. Inselt-Kovacs. (1993). Hereditary triosephosphate isomerase (TPI) deficiency: two severely affected brothers one with and one without neurological symptoms. *Hum. Genet.* **92**: 486-490.
- <http://www.expasy.ch/sprot/>. Consulta en línea. Acceso:16/09/2008.
- Jaenicke, R. (1987). Folding and Association of Proteins. *Prg. Biophys. Molec. Biol.* **49**: 117-327.
- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., y Sterner, R. (2000). Directed evolution of a ($\beta\alpha$)₈-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9925-9930.
- Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* (London). **350**:121-124.
- Kohlhoff, M., A. Dahm y Hensel, R. (1996). Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Letters.* **383**: 245-250.
- Lambeir, A., Opperdoes, F. R. y Wierenga, R. K. (1987). Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* **168**: 69-74.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, FC. y G. A. Petsko. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **29**: 6609-6618.

- Maes, D., Zeelen, J.P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H. D. Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1999). The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritime*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins: Struc. Func. Gen.* **37**: 441-453.
- Mainfroid, V., P. Terpstra., M. Beauregard, J. Frère., S. C. Mande., W. G. J. Hol., J. A. Martial y K. Goraj. (1996). Three hTIM Mutants that Provide New Insights on why TIM is a Dimer. *Journal of Molecular Biology.* **257**: 441-456.
- Maldonado, E., Soriano-Garcia, M. Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., y Perez-Montfort, R. (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Chem.* **283**:193-203.
- Mande, S. C., V. P. Mainfroid., K. H. Kalk., K. Goraj., J. A. Martial y Hol. W. G. J. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. *Protein Sci.* **3**: 810-821.
- Mateu. M. G., y Neira J. L. (2004). Plegamiento de proteínas y Enfermedades relacionadas. En: Estructura de proteínas. Gómez- Moreno, C. C. y Sancho, S. J. (1a Ed) Ariel, España. pp: 201-231.
- Mckee, T. y Mckee, J. (2003). Bioquímica. En: *La base molecular de la vida.* (3ª Ed) Mc Graw Hill interamericana, Madrid, pp: 672.
- Murphy, K. P. (2001). Protein Structure, Stability, and Folding. En: *Stabilitation of Protein Structure* (1ª Ed) Humana Press, Totowa, NJ. pp: 2-15.
- Nájera Peña. H. (1997). Cinética de renaturalización de la triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de glicerol. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.*
- Nájera Peña. H. (2003). Caracterización cinética y termodinámica del plegamiento y la asociación de la triosafosfato isomerasa. *Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM.*
- Nájera, H., Costas, M. y Fernández-Velasco, D. A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding. Insights into

the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* **370**: 785-792.

- Nelson D. L. y Cox M. M. (2005). Structure and Catalysis. En: *Lehninger. Principles of Biochemistry*. (4ª Ed). Worth Publishers, New York, USA. pp: 216
- Noble, M. E. M., J. P. Zeellen, J. P., K. Wierenga., V. Mainfroid., K. Goraj., A. C. Gohimont y Martial, J. A. (1993). Structure of triosephosphate isomerase from *E. coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog. Sect. D.* **49**:403-417.
- Oh-Ishi M. y Maeda T. (2002). Separation techniques for high molecular mass proteins. *J. chromatography B.* **771**: 49-66.
- Oláh, J., Orosz, F., Keseru, G., Kovári, Z., Kovács, J., Hollán, S. y Ovádi, J. (2002). Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. *Biochemical society transactions.* **30**: 30-37.
- Orosz, F., Oláh, J., Alvarez, M., Keseru, G. M., Szabo, B., Wágner, G., Kóvari, Z., Horányi, M., Baróti, K., Martial, J. (2001). Distinct behavior of mutant triosephosphate isomerase in hemolysate and in isolated from: molecular basis of enzyme deficiency. *Blood.* **98**: 3106-3112.
- Orosz, F., Vertéis B. G., Hollán, S., Horányi, M. y Ovádi, J. (1996). Triosephosphate isomerase deficiency: predictions and facts. *J. Theor. Biol.* **182**:437-447.
- Reyes-Vivas, H., Díaz, A., Peón, J., Mendoza-Hernández, G., Hernández-Alcantara, G., De la Mora-De la Mora, I., Enríquez-Flores, S., Domínguez-Ramirez, L., López-Velázquez, G. (2007). Disulfide Bridges in the Mesophilic Triosephosphate Isomerase from *Giardia lamblia* Are Related to Oligomerization and Activity. *J. Mol. Biol.* **365**: 752-763.
- Rietveld, A. W. y Ferreira S. T. (1996). Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* **35**: 7743-51.
- Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., Tuena, M., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A. y Torres-

Larios, A. (2008). Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: E104D is related to alterations of conserved water network at the dimer interface. *JBC*. pag: 1-20.

- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A. y Fernández-Velasco, D. A. (2002). Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* **322**:669-675.
- Rosa, R., Prehu, M. O., Calvin, M.C., Badoual, J., Alix, D. y Girod, R. (1985). Hereditary triosephosphate isomerase deficiency: seven new homozygous cases. *Hum. Genet.* **71**: 235-240.
- Sawyer, T. H. y R. W. Gracy. (1975). Ligand Binding and Denaturation Titration of Free and Matrix-Bound Triosephosphate Isomerase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **169**: 51- 57.
- Schneider, A. y Cohen-Solal, M. (1996). Hematologically important mutations: triosephosphate isomerase. *Blood Cells Mol. Dis.* **22**: 82-84.
- Shägger H. y von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of protein and peptides whit molecular masses 100,000-1000, and their detection whit picomolar sensitivity. *Electrophoresis.* **12** (5):352-366.
- Soberon-Mainero, X. (2002). La ingeniería genética y un campo de aplicación: la biocatálisis y la industria química limpia. *Mensaje bioquímico* **26**: 1-18.
- Sun, A. Q., Yüksel K. Ü. y Gracy R. W. (1992). Interactions between the Catalytic Centers and Subunit Interface of Triosephosphate Isomerase Probed by Refolding, Active Site modification, and Subunit Exchange. *Journal of Biological Chemistry.* **267**: 20168-20174.
- Téllez-Valencia A, Avila-Rios S, Pérez-Montfort R, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez M, López-Calahorra F, Gómez-Puyou A (2002). Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* **295**:958–963s .

- Uversky, V.N., Lee, He,Jin., Li, Jie., Fink, A.L. y Lee S.J. (2001). Stabilization of partially folded conformation during α -synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *J Biol Chem* **276** (47): 43495- 43498.
- Valentine, W. N. y Plagi, D.E. (1984). Erythrocyte enzymopathies, hemolytic anemia, and mutisistem disease: an annotated review. *Blood* **64**: 583-591.
- Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. y Murthy, M. R. (1997). Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* **5**: 751-761.
- Virchow, R. (1854). Zur Cellulose-Frage. *Virchows Arch* **6**: 415-426.
- Walden, H., Bell., G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R., y Taylor, G.L. (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **306**: 745-757.
- Wierenga, R. K., M. E. M. Noble., G. Vriend., S. Nauche y Hol, W. G. J. (1991). Refined 1.83 Å structures of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J.Mol.Biol.* **220**: 995-1015.
- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. y Wierenga, R. K. (1999). Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* **12**: 243-250.
- Willard, HH. (1988). *Instrumental Methods of Analysis*, Wadsworth, Inc., U.S.A.
- Zanella, A., Mariani, M., Colombo, M. B., Borgna-Pignatti, C., de Stefano, P., Morgese, G. y Sirchia, G. (1985). Triosephosphate isomerase deficiency: 2 new cases. *Scand. J. haematol.* **34**: 417-424.

